

网络出版时间: 2023-12-28 11:29:18 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0754.007>

幽门螺杆菌阿莫西林稳定耐药克隆的筛选及其基因突变的检测

陆秋丹^{1,2} 糜孟衡¹ 崔古贞^{1,3} 张峥嵘¹ 吴晓娟¹ 陈峥宏^{1,3}

摘要 目的 探讨阿莫西林(AMX)不稳定耐药的幽门螺杆菌(Hp)演化成AMX稳定高水平耐药的表型及其突变基因的检测。方法 以冻存后的Hp菌株H390作为出发菌株,在不断增加AMX浓度的培养基上连续传代,筛选对AMX耐药的克隆,检测耐药克隆的最小抑菌浓度(MIC),置于-80℃冻存3个月后再复苏,根据冻存后MIC下降情况判断其耐药性是否稳定。对获得的AMX最高MIC值的克隆H390r和出发菌株H390进行基因组测序分析和外排泵抑制试验,检测并鉴定与H390r获得的AMX高水平耐药性相关的基因突变。结果 通过AMX筛选获得4个AMX高水平耐药克隆,MIC分别为12、32、64和≥256 mg/L。经-80℃冻存后,

MIC均未发生改变。相比于亲本菌株H390,AMX稳定耐药克隆H390r存在多个基因的突变,包括与AMX耐药性相关的编码RND外排系统的*hefC*、编码孔蛋白的*hopB*与*hopC*和编码青霉素结合蛋白的*ftsI*。H390r在有外排泵抑制剂存在时对AMX的MIC大幅降低。结论 AMX能够在不稳定耐药的Hp中筛选出稳定耐药的克隆;H390r存在与AMX耐药相关的*hefC*、*hopB*、*hopC*和*ftsI*基因突变。这些突变可能是H390r获得AMX稳定高水平耐药的主要原因。

关键词 幽门螺杆菌;阿莫西林;不稳定耐药;稳定耐药

中图分类号 R 378.99

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)01-0039-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.007

2023-10-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81860353);贵州医科大学国基培育项目(编号:20NSP005);贵州省教育厅滚动支持省属高校科研平台团队项目(编号:黔教技(2022)019号)

作者单位:¹ 贵州医科大学基础医学院贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室,贵阳 550025

² 黔东南州人民医院检验科,凯里 556000

³ 贵州医科大学地方病与少数民族疾病教育部重点实验室(贵州省医学分子生物学重点实验室),贵阳 550004

作者简介: 陆秋丹,女,硕士研究生;

陈峥宏,女,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: chenzhenghong@gmc.edu.cn

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种革兰阴性微需氧病原菌,是慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关组织淋巴瘤的主要病因^[1-2]。Hp感染人群约占世界人口的一半以上^[3]。Hp的根除可以降低消化性溃疡和非溃疡性消化不良的风险,预防胃癌的发生^[3]。阿莫西林(amoxicillin, AMX)是Hp根除治疗的一线药物,近20余年,多种推荐的一线治疗方案根除率呈现不断下降的趋势,主要归因于Hp耐药性的增加^[4]。虽然目前的数据显示

mia (CML) cells, and the influence of miR-155 regulating the expression of heat shock proteins (HSP) 27, HSP60, HSP70. **Methods** Reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of miR-155 in CML-resistant imatinib (IM) cell line K562-G and CML cell line K562. K562-G cells were infected with the lentivirus carrying miR-155 or the negative control lentivirus, and they were named miR-155 group and control group. The effect of miR-155 on the proliferation of drug-resistant cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method. RT-qPCR and Western blot were used to detect the effect of miR-155 on the expression of heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70. Flow cytometry was used to detect the percentage of cell apoptosis in miR-155 group and control group. **Results** Compared with K562 cells, miR-155 showed low expression in K562-G cells ($P < 0.05$). The proliferation of miR-155 group cells decreased significantly from the 36th hour ($P < 0.05$). Compared with the control group, in the miR-155 group, HSP60 and HSP70 increased ($P < 0.05$), while HSP27 decreased ($P < 0.01$). The apoptosis rate of miR-155 group was higher than that of control group ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-155 promotes the apoptosis of chronic myeloid leukemia cells, increases the expression of HSP60 and HSP70, and decreases the expression of HSP27.

Key words miR-155; chronic myeloid leukemia; drug resistance; heat shock proteins; cell proliferation; apoptosis

Hp 对 AMX 的耐药率较低^[5],但存在阿莫西林联合治疗失败的情况。AMX 耐药株经 -80 °C 冻存 3 个月,最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)未变化称为稳定耐药; MIC 大幅下降甚至转变为敏感株称为不稳定性耐药^[6-7]。Hp 对 AMX 的耐药性同时具有稳定和不安定的表型,该研究通过探讨 AMX 不稳定耐药的 Hp 演化成 AMX 稳定高水平耐药表型的规律及其突变基因的检测,为控制 Hp 耐药性的发展和优化 Hp 治疗方案提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 本实验室保存的 1 株 Hp 菌株 H390 是从 1 名上消化道疾病患者胃黏膜中分离的已纯化菌株。研究经贵州医科大学附属医院人体医学伦理委员会批准,批号:2018 伦审第(100)号,患者均知情同意。患者胃黏膜标本接种于含 Hp 选择性抗生素和 7% 脱脂绵羊血的哥伦比亚血琼脂基础平板,37 °C 微需氧培养 72 ~ 96 h,挑取特征性菌落分离纯化后鉴定为 Hp^[8]。H390 菌株经 -80 °C 冻存后耐药性大幅下降,其对 AMX 具有不稳定的高水平耐药性,质控菌株 Hp ATCC 26695 由山东大学孙允东教授馈赠,菌株信息见表 1。根据欧洲抗菌药敏试验界值判断第 8 版和临床常使用的耐药断点^[7],本研究以 MIC ≥ 0.5 mg/L 作为判断 Hp 对 AMX 耐药的标准。以 MIC 不同分为低(MIC < 2 mg/L)、中(2 ~ 8 mg/L)、高(≥ 8 mg/L) 3 个耐药水平^[9]。

1.1.2 主要试剂和仪器 哥伦比亚血琼脂基础培养基购自青岛海博生物技术有限公司; Mueller-Hinton 琼脂培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司; 无菌脱纤维绵羊血购自河南巨石生物科技有限公司; Hp 选择性添加剂购自英国 OXOID 公司; 阿莫西林标准品(货号: YZ-A30409, 100 mg, 粉剂) 购自北京中国药品生物制品检定所; 尿素酶试纸购自珠海市克迪科技开发有限公司; 阿莫西林 E-test 药敏纸条购自意大利 Liofilchem 公司; 基因组文库构建试剂盒 SMRTbell Express Template Prep kit 2.0 试剂购

自美国 Pacific Biosciences 公司; 外排泵抑制剂 pABN 购自美国 MedChemExpress 公司。生物安全柜 HR40-II A2 购自青岛海尔公司; 超低温冰箱 DW-HL668 购自合肥中科美菱低温科技股份有限公司; CO₂ 培养箱 BB150 购自美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养条件和鉴定方法 Hp 接种于含 7% 脱纤维绵羊血的哥伦比亚血琼脂平板,在 37 °C 微需氧条件下(CO₂ 浓度 10%, 湿度 95% ~ 99%) 培养 72 ~ 84 h。菌株每次进行传代前后均进行菌体特征与生化反应观察,以镜检为革兰阴性弯曲杆菌且三酶(尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶) 试验均阳性鉴定为 Hp。每次传代后的菌株在含羊血的哥伦比亚血琼脂平板上进场分区划线,挑选单克隆扩大培养后用纯脱纤维绵羊血保存于 -80 °C 冰箱。

1.2.2 AMX 耐药株的筛选 菌株 H390 对 AMX 具有不稳定高水平耐药性,以冻存后 H390 菌株(冻存 18 个月) 为出发菌株筛选 AMX 高水平耐药克隆。将 AMX 标准品溶于生理盐水中配制成 1 000 mg/L 的 AMX 母液,在冷却至 55 °C 的含 7% 脱纤维绵羊血的哥伦比亚血琼脂培养基中添加不同体积的 AMX 母液,制成含不同 AMX 浓度的筛选平板。将培养 72 h 的 H390 稀释成约 1 × 10⁸ cfu/ml 的菌液,分别取 150 μl 菌液接种于含 AMX 浓度分别为 0.4、0.8、1.6 mg/L 的 3 块 AMX 筛选平板上,培养 72 h,观察菌落生长状况。存活的 Hp 传至相同浓度的 AMX 抗性平板,和更高浓度(原浓度 2 倍和 4 倍) 的 AMX 抗性平板,进行更高水平的 AMX 耐药筛选,并记录 Hp 在耐药筛选板的生长情况和传代次数。试验中每次传代均对筛选板上的菌株挑取单克隆并扩大培养后用于后续实验,共获得 20 个单克隆。

1.2.3 用 E-test 法检测耐药克隆对 AMX 的 MIC 分别对传代第 9(H390a)、14(H390b)、16(H390c) 和 20(H390r) 代获得的单克隆通过 E-test 法检测它们的 MIC^[10]。用接种环取培养 48 ~ 72 h 的 Hp 单克隆培养物于无菌生理盐水中,调整浊度为 McF = 2.0 后,取 150 μl 涂布接种于含 7% 绵羊血的 Mueller-Hinton 平板,涂布接种后将平板正向静置

表 1 菌株背景信息

菌株编号	分离地点	分离时间(年)	冻存前初始 MIC(mg/L)	冻存后 MIC(mg/L)	冻存时间(月)
H390	贵州	2019	≥256	0.5	18
26695	—	—	0.023	0.023	18

15 min,将 E-test 药敏条贴于培养基表面后,置于 CO₂ 培养箱 37 °C 微需氧条件下培养 72 h。通过观察抑菌区与 E-test 纸条浓度刻度的交点来确定 MIC 药敏试验均重复 3 次。

1.2.4 高水平 AMX 耐药克隆稳定性检测 取适量第 9 (H390a)、14 (H390b)、16 (H390c) 和 20 (H390r) 代高水平 AMX 耐药克隆分别混匀在 500 μl 脱纤维绵羊血中,置于 -80 °C 保存 3 个月后再进行复苏。根据冻存后 MIC 的变化情况判断耐药克隆对 AMX 的耐药性是否稳定^[7]。

1.2.5 全基因组测序 为了解获得的 AMX 稳定高水平耐药克隆的基因组变化,本研究对筛选获得的 AMX 稳定高水平耐药克隆 H390r (MIC ≥ 256 mg/L, 冻存后未改变) 与出发菌株 H390 (MIC 0.5 mg/L, 冻存前为 ≥ 256 mg/L) 进行全基因组三代测序比较分析。采用改良 CTAB 法^[11] 提取基因组 DNA,在 DNA 样品检测合格后,将 DNA 样品低温运送至武汉菲沙基因信息有限公司进行测序。使用基因组文库构建试剂盒 (SMRTbell Express Template Prep kit 2.0) 构建基因组文库,使用 PacBio Sequel II 测序平台进行测序,使用微生物组装 (smrtlink10)、HGAP4^[12] 和 Canu (v. 1.6)^[13] 软件重新组装 PacBio 读数。通过 pbalin (BLASR, v0.4.1)^[14] 工具分析基因组覆盖的深度。使用 Circos (v0.64)^[15] 获得 H390 和 H390r 菌株基因组的圆形图谱。最后利用 nucmer 进行两基因组比对,用 show-snps 程序进行单核苷酸多态性 (SNPs) 和缺失 (InDels) 检测。

1.2.6 外排泵抑制试验 在冷却至 55 °C 含有 7% 绵羊血的 Mueller-Hinton 培养基中加入外排泵抑制剂 pAβN,使培养基含 pAβN 的浓度为 100 mg/L,倾注平板后,采用 1.2.3 项的 E-test 法进行 H390 和 H390r 的 AMX 敏感性试验。检测在外排泵抑制剂存在下 H390 和 H390r 对 AMX 的敏感性变化。通过观察抑菌区与 E-test 纸条浓度刻度的交点来确定 MIC 药敏试验均重复 3 次。

2 结果

2.1 AMX 耐药克隆筛选 亲本菌株 H390 (冻存 18 个月) 在含 AMX 平板上进行耐药筛选,连续传 20 代获得 20 个耐药克隆,20 个耐药克隆进行革兰染色镜检均为革兰染色阴性弯曲杆菌,且三酶试验均为阳性。

2.2 E-test 法检测耐药克隆对 AMX 的 MIC 值 本研究选择第 9 (H390a)、14 (H390b)、16 (H390c)

和 20 (H390r) 代次的克隆通过 E-test 法进行 MIC 检测,4 个克隆的 MIC 分别为 12、32、64、256 mg/L,均为高水平耐药 (H390r MIC > 256 mg/L 已超出 E-test 试纸条的最大检测范围,以 = 256 mg/L 表示),耐药性逐渐增加,耐药性演化过程如图 1 所示。

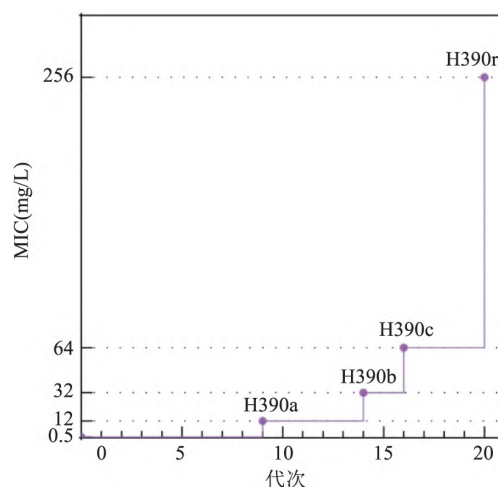


图 1 H390 菌株在培养基上对 AMX 耐药性演化过程

2.3 4 个 AMX 高水平耐药克隆稳定性检测结果

将 H390a、H390b、H390c 和 H390r 4 个 AMX 高水平耐药克隆在 -80 °C 冻存 3 个月后复苏,检测其 MIC 均未发生改变,表明 Hp 对 AMX 的不稳定耐药表型可以在体外连续的 AMX 接触后演化成稳定的耐药表型。

2.4 H390r 和 H390 的全基因组序列比较分析结果

筛选获得的 AMX 稳定高水平耐药克隆 H390r (MIC ≥ 256 mg/L) 与出发菌株 H390 (MIC 为 0.5 mg/L) 的序列已上传至 NCBI, H390 的登录号为 CP116234.1, H390r 的登录号为 CP125966。与 H390 相比, H390r 存在较多突变位点,其中在编码 RND 外排系统、孔蛋白和青霉素结合蛋白系统的基因中的突变位点 (不包含同义突变) 存在 5 个基因的 14 个氨基酸替换和 2 个移码突变 (表 2)。它们分别是: 在编码外排泵系统的 *hefC* 基因中存在 2 个非同义突变 (N845K 和 D974Y); 在编码孔蛋白的 *hopB*、*hopC* 和 *hopG* 基因中均发生了突变,其中 *hopC* 存在的突变最多,包括 6 个非同义突变、2 个移码突变和 1 个终止密码子突变 (终止密码子的突变会导致翻译提前结束,这可能导致蛋白质异常缩短,对其编码蛋白质功能产生影响); 在编码青霉素结合蛋白的基因中仅存在编码 penicillin-binding protein 2 的 *ftsI* 基因的 3 个非同义突变 (P126H、A367V 和

表2 H390r 编码 RND 外排系统、孔蛋白和青霉素结合蛋白系统的基因突变

基因名称	描述	突变类型	突变位点	氨基酸变化
<i>hefC</i>	efflux RND transporter permease subunit HefC	非同义突变	2535C > A	N845K
<i>hefC</i>	efflux RND transporter permease subunit HefC	非同义突变	2920G > T	D974Y
<i>hopG</i>	Hop family outer membrane protein HopG	非同义突变	1241C > T	A414V
<i>ftsI</i>	penicillin-binding protein 2	非同义突变	377C > A	P126H
<i>ftsI</i>	penicillin-binding protein 2	非同义突变	1100C > T	A367V
<i>ftsI</i>	penicillin-binding protein 2	非同义突变	1232A > T	N411I
<i>hopB</i>	outer membrane protein HopB	非同义突变	680G > A	S227N
<i>hopC</i>	outer membrane protein HopC	非同义突变	1096G > T	G366W
<i>hopC</i>	outer membrane protein HopC	非同义突变	662A > G	D221G
<i>hopC</i>	outer membrane protein HopC	非同义突变	650G > A	R217Q
<i>hopC</i>	outer membrane protein HopC	非同义突变	619A > G	N207D
<i>hopC</i>	outer membrane protein HopC	非同义突变	617A > C	Q206P
<i>hopC</i>	outer membrane protein HopC	突变成终止密码子	616C > T	Q206X
<i>hopC</i>	outer membrane protein HopC	非同义突变	560C > T	A187V
<i>hopC</i>	outer membrane protein HopC	插入移码	639dupC	Q213fs

符号 > 前: 突变前的碱基; 符号 > 后: 突变后的碱基; dup: 插入碱基; del: 删除碱基

N411I) 未发现 *pbp1* 基因的突变。

2.5 外排泵抑制试验结果 在添加 100 mg/L 外排泵抑制剂 pAβN 的培养基中进行药敏试验, 结果显示: H390 在添加 pAβN 后 MIC 未发生改变 (表 3); H390r 在添加 pAβN 后 MIC 大幅下降。其中, 不含 pAβN 血平板中未见抑菌圈 (图 2A), 含 100 mg/L pAβN 血平板中可见抑菌圈, 抑菌区与 E-test 纸条浓度刻度的交点为 12 (图 2B)。结果表明外排泵活性的增强是引起 H390r 对 AMX 稳定的高水平耐药的原因之一。

表3 有无外排泵抑制剂下 H390 和 H390r 对 AMX 的 MIC 值 (mg/L)

菌株	不添加外排泵抑制剂	添加 100 mg/L pAβN
H390r	≥256	12
H390	0.5	0.5

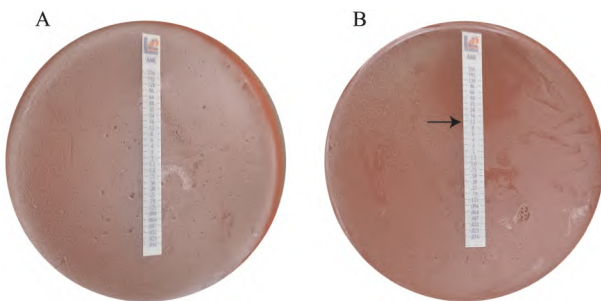


图2 在未添加或添加 pAβN 的血平板上 H390r 对 AMX E-test 试验结果

A: 不含 pAβN 的血平板; B: 含 100 mg/L pAβN 的血平板

3 讨论

通常认为耐药性是抗生素治疗细菌感染失败的

最主要原因。近年来, 临床上包含 AMX 的 Hp 治疗方案根除率逐年降低, 但实验室检测到的 AMX 耐药率仍然较低。Hp 对 AMX 的耐药性存在 -80 °C 冻存耐药性表型丢失的现象^[6-7]。

Han et al^[6] 报道在德国分离出的 7 株对 AMX 高水平耐药 (MIC ≥ 256 mg/L) 的 Hp 菌株, 有 4 株是稳定耐药, 有 3 株是不稳定耐药, 并提出 Hp 存在对 AMX 稳定和不稳定耐药 2 种现象, 是否有必要在根除治疗之前进行抗生素耐药性检测的疑问。但到目前为止, 引起 Hp 对 AMX 不稳定耐药的机制仍未清楚, 这为 Hp 的 AMX 耐药性检测带来了困难。近年来, Han et al^[7] 选择未冻存的临床分离菌株作为出发菌株, 通过 AMX 耐药筛选获得了 1 个对 AMX 高水平耐药 (MIC ≥ 256 mg/L) 的 Hp 克隆, 该克隆经 -80 °C 冻存后 MIC 下降至 0.5 mg/L, 经 -80 °C 冻存的克隆下调的基因在质膜中显著富集, 提示 -80 °C 冻存后 Hp 对 AMX 耐药性降低可能与膜结构和转运功能相关基因的下调有关。为了解 -80 °C 冻存后是否会使 Hp 对 AMX 的耐药性产生不可逆的损伤, 本实验选择了对 AMX 不稳定耐药的经 -80 °C 冻存后的克隆 (H390) 作为出发菌, 经 AMX 耐药筛选高水平耐药克隆。结果显示, AMX 不稳定耐药的 Hp 仍然能演化成 AMX 稳定高水平耐药的表型。故 AMX 不稳定耐药 Hp 在未来应引起重视。

张艺瑶等^[9] 以标准菌株 ATCC43504 及 11 株未经冻存的临床分离株作为出发菌株, 通过 AMX 压力筛选获得 46 个 AMX 耐药克隆, 这些耐药克隆在低温冻存下耐药性存在一定比例下降, 这一现象在高耐药菌株尤为明显。而本文所筛选的 4 株高水

平耐药克隆均为稳定耐药,这可能是由于本研究选择的出发菌株本身为不稳定高水平耐药菌株引起的。此亲本菌株实验前经超低温冰箱的长时间冻存,不稳定高水平耐药性已丢失,只有当 AMX 耐药筛选时亲本菌株演化出稳定高水平耐药,才能检测其耐药性的升高。

为了解与稳定耐药相关的基因突变,本研究对经 AMX 耐药筛选获得最高 MIC 的稳定高水平耐药菌株 H390r 与出发菌株 H390 进行全基因组三代测序分析,结果显示,H390r 相较于 H390 在编码 RND 外排系统、孔蛋白和青霉素结合蛋白系统的基因中均存在突变。Hp 对 AMX 的耐药性通常由青霉素结合蛋白的变化、膜通透性的降低和通过外排泵系统外排药物引起^[16]。H390r 在 RND 外排泵系统有 *hefC* 基因的两个非同义突变。在革兰阴性菌中,RND 家族是多重耐药外排泵的代表。Hp 包含 3 个假定的 RND 外排系统: *hefABC*、*hefDEF* 和 *hefGHI*^[17]。*hefC* 是外排泵 *hefABC* 的一个组成部分,已有文献报道 *hefC* 的突变可以影响 Hp 对甲硝唑和 AMX 的耐药性^[18]。H390r 在外排泵系统上仅存在 *hefC* 基因的突变,且 H390r 在有外排泵抑制剂时对 AMX 的 MIC 下降幅度明显,提示 *hefC* 的突变是引起 H390r 对 AMX 稳定的高水平耐药的原因之一。H390r 在孔蛋白的 *hopB* 和 *hopC* 基因中也存在突变。抗菌药物与细菌作用时,细胞膜上的孔蛋白发生缺失或相应蛋白通道变窄,都会使大分子抗菌药物无法进入细菌体内,从而引起耐药。研究^[19]表明,编码外膜孔蛋白的 *hopB* 和 *hopC* 基因的突变可以导致 Hp 中 AMX 蓄积的减少引起 Hp 对 AMX 耐药的产生。因此,H390r 的 *hopB* 和 *hopC* 基因的突变也可能参与其 AMX 稳定的高水平耐药的形成。另外,编码青霉素结合蛋白的 *ftsI* 基因的突变可以赋予 Hp 对 AMX 耐药性^[20],本研究中 H390r 的 *ftsI* 基因存在 3 个非同义突变,也可能是 H390r 对 AMX 产生高水平耐药的原因。

上述结果表明,*hefC*、*hopB*、*hopC* 和 *ftsI* 突变的联合作用可能是 H390r 获得对 AMX 稳定的高水平耐药的主要原因,但该研究测序中未发现的其他突变也有可能引起 H390r 中的 AMX 稳定耐药性。细菌抗生素耐药性的演化是一个重要的医学课题。已有研究^[21]表明,低水平的 β -内酰胺类药物暴露会驱动细菌耐药性的进化。细菌耐药性的产生机制涉及自然的自发突变和选择。当抗生素存在时,只有获得耐药性相关自发突变的细菌才能存活,这是抗生

素具有选择功能的体现。但近年来几项研究^[22-23]表明,抗生素不仅能够提供选择性作用,且可以通过积极诱导突变,促进耐药细菌的出现。该研究中冻存后不稳定耐药克隆 H390 通过体外浓度不断增加的 AMX 接触演化出了 AMX 稳定高水平耐药克隆。通过全基因组测序技术和外排泵抑制试验分析了 H390r 对 AMX 稳定高水平耐药的原因可能主要由 *hefC*、*hopB*、*hopC* 和 *ftsI* 的突变引起。但引起 Hp 对 AMX 耐药机制复杂,目前仍有很多未解决的问题。全面了解 Hp 对 AMX 的耐药性,将有助于更好地控制耐药性的发展和优化耐药性检测方法。

参考文献

- [1] Warren J R, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis [J]. Lancet (London, England), 1983, 1(8336): 1273-5.
- [2] Senchukova M A. *Helicobacter pylori* and gastric cancer progression [J]. Curr Microbiol, 2022, 79(12): 383.
- [3] Du Y, Zhu H, Liu J, et al. Consensus on eradication of *Helicobacter pylori* and prevention and control of gastric cancer in China (2019, Shanghai) [J]. J Gastroen Hepatol, 2020, 35(4): 624-9.
- [4] 张建中. 中国幽门螺杆菌治疗低根除率现状及应对策略 [J]. 胃肠病学和肝病杂志 2017 26(6): 637-9.
- [5] Jiang Z, Qian X, Wang Z, et al. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from patients in Nanjing, China: a cross-sectional study from 2018 to 2021 [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 970630.
- [6] Han S R, Bhakdi S, Maeurer M J, et al. Stable and unstable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*: Should antibiotic resistance testing be performed prior to eradication therapy? [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(8): 2740-1.
- [7] Han X, Zhang Y, He L, et al. Genetic and transcriptomic variations for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* under cryopreservation [J]. Pathogens, 2021, 10(6): 676.
- [8] 吴芳草,王琼,朱键,等. 贵阳地区 351 株幽门螺杆菌药物敏感性及其 *pbp1* 多样性分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(7): 587-93.
- [9] 张芝瑶,何利华,胡源,等. 低温冻存对幽门螺杆菌阿莫西林耐药表型的影响分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(5): 497-500.
- [10] Li H, Shen Y, Song X, et al. Need for standardization and harmonization of *Helicobacter pylori* antimicrobial susceptibility testing [J]. Helicobacter, 2022, 27(2): e12873.
- [11] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. Plant Mol Biol Rep, 1997, 15(1): 8-15.
- [12] Chin C-S, Alexander D H, Marks P, et al. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing da-

- ta [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(6) : 563 – 9.
- [13] Koren S, Walenz B P, Berlin K, et al. Canu: scalable and accurate long-read assembly *via* adaptive k-mer weighting and repeat separation [J]. *Genome Res*, 2017, 27(5) : 722 – 36.
- [14] Chaisson M J, Tesler G. Mapping single molecule sequencing reads using basic local alignment with successive refinement (BLASR) : application and theory [J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 238.
- [15] Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics [J]. *Genome Res*, 2009, 19(9) : 1639 – 45.
- [16] Zanotti G, Cendron L. Structural aspects of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1149: 227 – 41.
- [17] Bina J E, Alm R A, Uria-Nickelsen M, et al. *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics *in vitro* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(2) : 248 – 54.
- [18] Kutschke A, De Jonge B L M. Compound efflux in *Helicobacter pylori* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7) : 3009 – 10.
- [19] Co E-M A, Schiller N L. Resistance mechanisms in an *in vitro*-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(12) : 4174 – 6.
- [20] Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, et al. Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(5) : 995 – 8.
- [21] Adam M, Murali B, Glenn N O, et al. Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria [J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 52.
- [22] Kohanski M A, Depristo M A, Collins J J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance *via* radical-induced mutagenesis [J]. *Mol Cell*, 2010, 37(3) : 311 – 20.
- [23] Long H, Miller S F, Strauss C, et al. Antibiotic treatment enhances the genome-wide mutation rate of target cells [J]. *PNAS*, 2016, 113(18) : e2498 – 505.

Screening of stable amoxicillin resistant clones of *Helicobacter pylori* and detection of its gene mutations

Lu Qiudan^{1, 2}, Mi Mengheng¹, Cui Guzhen^{1, 3}, Zhang Zhengrong¹, Wu Xiaojuan¹, Chen Zhenghong^{1, 3}

(¹Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou, School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025; ²Dept of Laboratory, Qiandongnan Prefecture People's Hospital, Kaili 556000); ³Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Key Laboratory of Medical Molecular Biology of Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To investigate the phenotype of amoxicillin (AMX) unstable resistant *Helicobacter pylori* (Hp) evolving into AMX stable high level resistance and the detection of its mutated genes. **Methods** Using the frozen Hp strain H390 as the starting strain, the clones resistant to AMX were continuously cultured on the medium with increasing AMX concentration, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of the resistant clones was detected. After frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 months, the drug resistance was stable according to whether the MIC decreased after frozen storage. Genome sequencing analysis and efflux pump inhibition assay were performed on cloned H390r and parental strain H390 with the highest AMX MIC value, and gene mutations associated with the high level AMX resistance obtained by H390r were detected and identified. **Results** Four AMX high level resistant clones were obtained by AMX screening with MICs of 12, 32, 64 and $\geq 256\text{ mg/L}$, respectively, and none of the MICs were altered after freezing at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Compared to the parental strain H390, the AMX stable resistant clone H390r had mutations in several genes, including *hefC* encoding the RND efflux system, *hopB* and *hopC* encoding the pore proteins and *ftsI* encoding the penicillin binding protein, which were associated with AMX resistance. H390r was substantially reduced in MIC to AMX in the presence of efflux pump inhibitors. **Conclusion** AMX can screen stable resistant clones from unstable resistant Hp. H390r had mutations in *hefC*, *hopB*, *hopC*, and *ftsI* associated with AMX resistance. These mutations may be the main reason why H390r acquired a stable high level of resistance to AMX.

Key words *Helicobacter pylori*; amoxicillin; unstable resistance; stable resistance